

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1102193-4 A2



(22) Data de Depósito: 23/05/2011
(43) Data da Publicação: 14/01/2014
(RPI 2245)

(51) Int.Cl.:

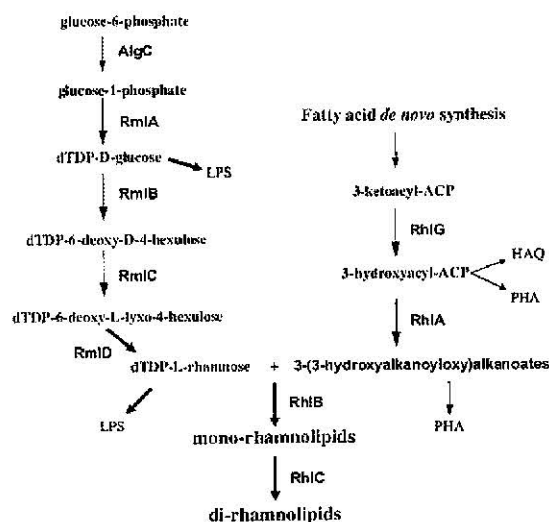
C02F 3/34
C12N 1/21
C12P 19/02
C07H 15/06
C12R 1/01
C02F 101/32

(54) **Título:** BURKHOLDERIA KURURIENSIS GENETICAMENTE MODIFICADA, MÉTODO PARA DE BIOSSURFACTANTES DO TIPO RAMINOLIPÍDEOS E USOS

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) **Inventor(es):** Bianca Cruz Neves, Danielly Chagas de Oliveira Mariano, Luiz Fernando Dias Tavares, Patrícia Silva Freire De Lima

(57) **Resumo:** BURKHOLDERIA KURURIENSIS GENETICAMENTE MODIFICADA, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES DO TIPO RAMINOLIPÍDEOS E USOS. A presente invenção descreve Burkholderia kururiensis geneticamente modificada (LMM2I) e um método de utilização da engenharia genética como ferramenta para a produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo em uma cepa não patogênica, B. kururiensis KP23T, como hospedeira heteróloga, através da inserção de plasmídeos contendo os genes rhlA, oriundos da cepa de Pseudomonas seruginosa PAO1, responsáveis pela produção das enzimas componentes da Rhamnosiltransferase 1 (RhlA e RhlB), envolvidas na produção de mono-raminolipídeos e seu uso em biorremediação de solos e águas, que apresentam contaminação por hidrocarbonetos.



BURKHOLDERIA KURURIENSIS GENETICAMENTE MODIFICADA, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES DO TIPO RAMINOLIPÍDEOS E USOS

CAMPO TÉCNICO

5 A inovação ora proposta diz respeito à *Burkholderia kururiensis* geneticamente modificada (LMM21) e a um método de utilização da engenharia genética como ferramenta para a produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo em uma cepa não patogênica, *B. kururiensis* KP23^T, como hospedeira heteróloga, através da inserção de plasmídeos contendo os genes
10 *rhlAB*, oriundos da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, responsáveis pela produção das enzimas componentes da Rhamnosiltransferase 1 (RhlA e RhlB), envolvidas na produção de mono-raminolipídeos a serem utilizados em biorremediação de solos e águas, que apresentam contaminação por hidrocarbonetos.

ESTADO DA ARTE

15 A indústria do petróleo, devido ao seu crescimento e grande movimentação de petróleo por transporte marítimo, vem registrando diversos acidentes ambientais envolvendo navios, portos, terminais, oleodutos e refinarias, entre outras fontes. Nos ambientes naturais, o petróleo é de difícil
20 remoção porque os hidrocarbonetos se adsorvem a superfícies, causando sérios danos ao meio ambiente. Estratégias biotecnológicas e sustentáveis apresentam-se como um grande desafio e um vasto campo para a pesquisa de novas soluções para a remediação destes casos. A remediação e biorremediação de solos e águas impactados por petróleo caracterizam-se
25 como tecnologias limpas, embora ainda de alto custo, que permitem a recuperação de locais contaminados. O emprego de micro-organismos naturais (biorremediação) ou a administração de biossurfactantes, geralmente

produzidos em regime de contenção, promovem a remoção eficiente dos contaminantes adsorvidos ao solo. A produção de surfactantes biológicos é, portanto, uma importante alternativa aos produtos existentes.

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas que se acumulam em interfaces, diminuem tensões interfaciais e formam estruturas agregadas como as micelas (Van Hamme *et al.*, 2006) e são produzidos por fungos e bactérias a partir de diferentes substratos como óleos, açúcares e rejeitos (Li, 1996). Essas moléculas apresentam uma porção hidrofóbica, que pode ser composta por uma cadeia de ácido graxo hidroxil ou α -acil- β -hidroxil, além de uma porção hidrofílica, que pode ser composta por carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos ou álcoois (Mulligan, 2005). Estudos sobre a contaminação por petróleo concluíram que os biossurfactantes produzidos por micro-organismos isolados do solo e da água são os mais apropriados para a biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes naturais, devido à sua capacidade de emulsificação, que incrementa a remoção de contaminantes nesses ambientes.

Comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem algumas características próprias, como (i) um ou mais grupos funcionais e centros quirais; (ii) estruturas complexas e volumosas; (iii) alta degradabilidade e baixa toxicidade; (iv) baixas CMCs e alta atividade surfactante; (v) habilidade para formação de estruturas multimoleculares e cristais líquidos; (vi) atividade biológica; (vii) baixa sensibilidade a condições extremas de pH, salinidade e temperatura e; (viii) podem ser produzidos a partir do uso de substratos renováveis (Bognolo, 1999; Desai e Banat, 1997; Kitamoto *et al.*, 2002). A Tabela 1 apresenta uma comparação entre surfactantes químicos e biossurfactantes em função de suas propriedades físico-químicas.

Tabela 1. Valores de tensão superficial e CMC de alguns surfactantes (Bognolo, 1999).

Surfactante	Tensão Superficial (mN/m)	CMC (mg/L)
Biossurfactantes (microrganismo)		
Trealoselipídeo (<i>R. erythropolis</i>)	37	15
Ramnolipídeo (<i>P. aeruginosa</i>)	29	20-200
Soforoselipídeo (<i>C. bombicola</i>)	37	82
Surfactina (<i>B. subtilis</i>)	27	11
Surfactantes Sintéticos Aniônicos		
Alquilato dodecilbenzeno (LABS)	47	590
Span	-	80
SLS ou SDS	37	2023-2890

Os glicolipídeos comportam uma classe de biossurfactantes que são compostos por carboidratos em combinação com ácidos graxos alifáticos ou hidroxi-alifáticos de cadeia longa. Os ramnolipídeos são glicolipídeos formados por uma ou duas moléculas de α -raminose ligadas à uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxialcanóico (predominantemente cadeias C_{10}), sendo produzidos majoritariamente pela bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. As propriedades principais dos ramnolipídeos incluem: ação detergente; formação de espuma; emulsificação; desemulsificação; solubilização; molhamento; ação espessante; sequestro de metais; formação de vesículas; e dispersão de fases, entre diversas outras. Essas características, associadas com o perfil anfifílico, permitem o acúmulo destes biossurfactantes entre fases fluídas, reduzindo, portanto, a tensão superficial e interfacial. Ramnolipídeos podem reduzir a tensão superficial de 72mN/m para valores em torno de 30mN/m, e a tensão interfacial entre água e óleo para valores inferiores a 1mN/m. Devido à sua cauda de ácido carboxílico, estes são considerados ácidos fracos, sendo conhecidos por sofrer agregação em solução. Quando atingem concentrações acima da concentração micelar

crítica (CMC), são formadas diferentes estruturas, como micelas, vesículas, ou lamelas, dependendo do pH da solução, da concentração, e da presença de eletrólitos.

Os ramnolipídeos, junto aos soforolipídeos e à surfactina, são os
5 únicos biossurfactantes atualmente comercializados. Além disso, esses glicolipídeos são os únicos biossurfactantes que já foram aprovados pela agência americana de proteção ambiental para o uso em alimentos, cosméticos e fármacos (Nitschke e Costa, 2007).

A predominância de mono ou di-raminolipídeos e seu efeito na
10 ação surfactante da mistura, em função do aumento ou diminuição da hidrofobicidade da mistura gerada pode variar consideravelmente. Portanto, a avaliação individual da contribuição de cada homólogo para as propriedades da mistura de raminolipídeos pode permitir a elaboração do "design" de moléculas surfatantes com propriedades desejáveis para determinados tipos de aplicação.

15 Devido às suas propriedades, os biossurfactantes do tipo raminolipídeo encontram múltiplas aplicações, englobando as indústrias cosmética, alimentícia, farmacêutica, papelreira, de metais, cerâmicas, entre outras. No entanto, a aplicação mais discutida para estes produtos se concentram na área ambiental, envolvendo biorremediações. Esta última se
20 apresenta como o maior mercado para os raminolipídeos. Estes podem ser utilizados para a biorremediação de hidrocarbonetos de solos contaminados e água, em remoção de metais pesados, em lavagem de solos e na remediação de derramamentos de óleo. Também podem ser aplicados no aumento da remoção de arsênico e metais pesados em rejeitos de minas.

25 Shin e colaboradores observaram que o pH influenciava a solubilização de fenatreno por raminolipídeos, e que as vesículas multilamelares formadas a pH 5.0 eram as mais efetivas na solubilização do

contaminante. Foi postulado também que através do aumento da concentração de ramnolípídeos, a absorção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pelas raízes de azevém poderia ser diminuída. Gustafsson e colaboradores observaram que o uso de ramnolípídeos foi eficiente para o controle do florescimento de algas tóxicas, sem efeitos colaterais ao ecossistema. Urum e Pekdemir mostraram que a lavagem de solos com uma solução a 0.1% de ramnolípídeos comercialmente disponibilizados removeram cerca de 75% do óleo. A ação na área de controle biológico, pela inibição do crescimento de patógenos de plantas, também vêm sendo reportada. Este trabalho inspirou o desenvolvimento de um biofungicida, considerado como não-mutagênico e com baixa toxicidade a mamíferos, já tendo sido aprovado pela FDA (Federal Drug Administration) para o uso direto no cultivo de vegetais, legumes e frutas. Foi também relatado que um produto a base de uma solução 0.1% de ramnolípídeos agia como um estimulante para as defesas naturais das plantas contra fungos patogênicos.

Na área de alimentos, as propriedades inerentes a estes compostos são extremamente úteis. As atividades anti-adesiva e antimicrobiana, por exemplo, são propriedades exploráveis por essa indústria. Na culinária e na formulação de sorvetes, estes compostos podem auxiliar no controle e estabilidade da consistência, e na dissolução de óleos de aroma e sabor. Agem como estabilizantes de gorduras, também servindo para evitar derramamentos e borrifamento do óleo durante processos de cozimento. Agem também como conservantes, pela ação antimicrobiana gerada pela adição destes à formulação de alimentos desde pães até leite UHT (Nitschke *et al*, 2011).

O tratamento de superfícies com ramnolípídeos, como estratégia para o retardamento da adesão bacteriana e da formação de biofilmes também

vêm sendo investigada. Borrachas de silicone condicionadas com raminolípídeos reduziram as taxas de adesão de *S. salivarius* e *C. tropicalis* em 66%. O número de células aderidas de *S. epidermidis*, *S. salivarius* e *C. tropicalis* foi reduzido em 48%, e o desprendimento de quaisquer células aderidas pela adição do biossurfactante chegou a 96%.

A utilização desses biossurfactantes na indústria cosmética e farmacêutica como emulsificantes, agentes penetrantes e em sistemas de endereçamento de drogas é uma área emergente. Aplicações diversas na área médica vêm sendo reportadas, como o efeito na imunossupressão celular, sendo também observadas interações *in vitro* com culturas de fibroblastos e keratinócitos, e a inibição do crescimento de células tumorais de mama (MCF-7). O tratamento de uma úlcera decúbita com um medicamento contendo 0.1% de di-raminolípídeos também já foi relatado. Aplicações emergentes na área farmacêutica e cosmética irão gerar uma maior demanda por estas biomoléculas, especialmente por permitir que os benefícios de seu uso possam superar os custos de produção. Além disso, a conscientização dos consumidores e as demandas de agências reguladoras aumentam a necessidade do uso de produtos “ecofriendly”. O mercado global de surfactantes alcançou US\$24,33 bilhões em 2009, quase 2% a mais que no ano anterior (Acmite Market Intelligence). Com a recuperação da economia global em 2010, o esperado é que o crescimento atinja 2,8 % até 2012. Este grande mercado abrange áreas das mais diversas, como a indústria de petróleo, de alimentos, cosméticos, agricultura e biorremediação.

Porém, a produção de biossurfactantes em larga escala envolve elevado custo quando comparado aos surfactantes químicos, uma vez que seus níveis de produtividade não compensam o custo dos substratos e infraestrutura empregados na sua produção. Portanto, os biossurfactantes
5 ainda não são economicamente competitivos no mercado, em relação aos compostos sintetizados quimicamente. Atualmente, a produção comercial de ramnolipídeos é restrita, e os preços mais atuais estão na casa de US\$200 por kg (Solução de 20%) e US\$6000 por kg (Pureza de 98%) (Leitermann *et al.*, 2010). Para tornar a produção de ramnolipídeos competitiva com os
10 surfactantes do mercado é essencial reduzir os custos de produção e aumentar substancialmente a produtividade atual.

A economia que rege a produção de qualquer metabólito microbiano pode ser governada por três regras:

1. Custos iniciais do material;
- 15 2. Disponibilidade de procedimentos economicamente viáveis de produção e recuperação do produto;
3. Índices de produção do micro-organismo produtor.

Para que o processo de produção do biossurfactante seja viabilizado, algumas estratégias devem ser consideradas. Entre elas, a
20 utilização de matérias-primas de baixo custo, ou ainda de rejeitos, como substrato, para diminuir o gasto inicial do processo, que pode chegar a 30% do total; o desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultivo e de recuperação; o desenvolvimento e uso de cepas

mutantes ou recombinantes superprodutoras para o aumento do rendimento do processo. As duas primeiras estratégias vêm sendo exploradas em grande extensão, sendo reportadas como excelentes estratégias para o aumento da produção. A terceira, no entanto, não foi explorada em seu máximo potencial
5 (Mukherjee *et al.*, 2006).

O tipo e quantidade da matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Considera-se que esta parte do processo possa envolver entre 10 e 30% do custo total do processo biotecnológico. Para reduzir este custo, portanto, é interessante o uso de
10 substratos de baixo valor. Para isto, a utilização de rejeitos agrícolas e industriais é uma estratégia a ser considerada.

Um rejeito produzido em crescentes quantidades nos últimos anos é o glicerol, devido ao crescimento da indústria do biodiesel. Tal cenário tem levado a uma diminuição dos preços deste substrato, e os níveis de consumo
15 estão bem abaixo dos de produção, levando algumas empresas a terem que arcar com elevados custos de disposição (da Silva *et al.*, 2009). A maioria das indústrias de produção de biodiesel no Brasil e no mundo faz uso do catalisador químico NaOH. Devido às atuais condições de processo, o glicerol gerado por essa indústria apresenta características como alta alcalinidade,
20 presença de contaminantes como triacilgliceróis, sabões, altas concentrações salinas e outros elementos traços, que dificultam seu uso direto, sendo necessário seu devido tratamento, o que representa custos adicionais. O uso da glicerina bruta obtida da indústria do biodiesel como substrato em meios de cultivo representa uma estratégia interessante, uma vez que elimina a etapa de

purificação e o problema da disposição deste rejeito e faz uso de um substrato de custos irrisórios.

Considerando o potencial da agroindústria no país, a utilização de recursos renováveis como, por exemplo, os óleos vegetais e rejeitos agroindustriais, podem ser também considerados como uma boa estratégia a ser considerada. A principal vantagem de se utilizar substratos renováveis é a redução dos custos de produção e também a diminuição do descarte de rejeitos dessa indústria. Resíduos como borras, óleo de fritura usado e melaço de cana já foram testados para a produção de raminolipídeos.

Além da utilização de substratos de baixo custo, estratégias de cultivo devem ser consideradas para que altos índices de produção sejam atingidos. Estratégias envolvendo o uso de bateladas alimentadas geraram em concentrações finais de 32.0 e 45.0 g/L. Estudos envolvendo a produção por fermentação em estado sólido envolvendo uma mistura de bagaço de cana, repasto de sementes de girassol e glicerol geraram 46.0 g/L de raminolipídeos.

Bioprocessos industriais muitas vezes se baseiam em cepas microbianas hiperprodutoras. Mesmo com materiais de baixo custo, meio e condições de cultivo otimizados, e processos de recuperação otimizados, um processo de produção não pode ser comercialmente viabilizado e rentável enquanto os índices de produção final pelo micro-organismo não forem altos. Ainda mais, o processo de produção industrial é dependente da disponibilidade de hiperprodutores recombinantes ou mutantes se esses níveis de produção não são encontrados naturalmente na cepa selvagem. Mesmo que estas produzam bastante, ainda assim estratégias de melhoramento genético ainda

são interessantes, para otimizar ao máximo o rendimento do processo (Mukherjee *et al.*, 2006). O uso de estratégias de biologia molecular, envolvendo a geração de cepas superprodutoras de raminolipídeos, é, portanto, um campo a ser explorado.

5 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E OS RAMINOLIPÍDEOS

Pseudomonas aeruginosa é uma espécie de bactéria Gram-negativa, pertencente à classe das Proteobactérias, que está presente em um vasto número de nichos ecológicos, sendo capaz de utilizar diversos compostos para obtenção de nutrientes (Soberón-Chavez *et al.*, 2005).
10 Apresenta diversas aplicações biotecnológicas, como a capacidade de degradar alcanos de cadeia ramificada e de produzir biossurfactantes (raminolipídeos) e polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros de ácidos graxos. Os raminolipídeos apresentam diversas aplicações industriais e os PHAs podem ser empregados na produção de plásticos biodegradáveis (Soberon-
15 Chavez *et al.*, 2005).

P. aeruginosa é o micro-organismo mais descrito na literatura como produtor de biossurfactantes do tipo raminolipídeos. Raminolipídeos são biossurfactantes do tipo glicolipídeo, sendo compostos por uma ou duas moléculas de L-raminose (fração hidrofílica) e uma ou duas cadeias de ácido
20 graxo (fração hidrofóbica). Atualmente, diversas aplicações deste tipo de biossurfactante estão descritas, tornando-o um produto de considerável valor agregado, sendo também atualmente comercializado.

Um dos fatores que contribuem positivamente para trabalhos com metabólitos produzidos pela *P. aeruginosa* é o fato de o sequenciamento do
25 genoma estar disponível desde 2000 (Stover *et al.*, 2000), facilitando

manipulações genéticas e o emprego de tecnologias de Biologia Molecular, que envolvem o material genômico da espécie em questão.

Além do conhecimento do genoma de *P. aeruginosa*, a via biossintética dos raminolipídeos é bem estabelecida conforme mostrado na Figura 1, onde os círculos indicam as duas enzimas empregadas na engenharia metabólica de *B. kururiensis*, o que influencia favoravelmente o emprego deste micro-organismo como protótipo na produção de biossurfactantes glicolipídicos.

A via biossintética dos raminolipídios apresenta ligações metabólicas com numerosos outros produtos de síntese bacterianos, que dependem de outras vias centrais do metabolismo bacteriano, como as vias biossintéticas de ácidos graxos e açúcares. Apresenta também etapas em comum com as vias biossintéticas dos poli-hidróxi-alcanoatos (PHAs, outros compostos de interesse biotecnológico) e de estruturas da superfície celular como lipopolissacarídeos e alginato. Os raminolipídeos são produzidos por duas reações sequenciais. A primeira reação é catalisada por um complexo enzimático denominado raminosil-transferase 1 (Rt1), codificada pelo operon *rhIAB* e utiliza dTDP-L-raminose e precursores de ácido β -hidróxi-decanóico, gerando monoramnolipídios. Juntamente com dTDP-L-raminose, monoramnolipídios são substratos da raminosil-transferase 2 (Rt2), codificada pelo gene *rhIC*. A enzima RhIG é responsável pelo deslocamento de componentes da fração lipídica dos raminolipídios, a partir da via biossintética dos ácidos graxos em direção à via biossintética dos raminolipídios. O operon *rmIBDAC* codifica enzimas envolvidas da síntese de dTDP-L-rhamnose, outra fração precursora de raminolipídios.

A engenharia metabólica tem sido de grande utilidade no desvio de fluxos metabólicos, visando à produção em larga escala de produtos de interesse em biotecnologia, estratégia esta empregada neste projeto. O

emprego de hospedeiros heterólogos não patogênicos para a expressão dos genes de *P. aeruginosa* envolvidos na biossíntese de raminolipídeos representa um importante objeto da presente proposta de trabalho. O manuseio de micro-organismos não patogênicos no ambiente laboratorial/industrial constitui uma situação ideal e perfeitamente viável.

A produção de raminolipídeos depende diretamente de fatores nutricionais, como concentração de nitrogênio, pH, temperatura e limitação de fosfato (Guerra-Santos *et al.*, 1986). O estabelecimento de condições ótimas para a obtenção desta biomolécula de elevado potencial aplicativo em diversos setores da indústria tem sido alvo de muitos estudos e trabalhos em nosso grupo durante os últimos dez anos. Ao longo deste período, o Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da UFRJ vem desenvolvendo, em cooperação com a Petrobras, projetos que visam aumentar a produção de ramnolipídeos, um biossurfactante pertencente ao grupo dos glicolipídeos, por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolada de poços de petróleo. Diversos estudos envolvendo a otimização e escalonamento do processo, além da aplicação deste composto, já foram realizados pelo grupo: Santa Anna e colaboradores (2001 e 2002), após o isolamento e caracterização do biossurfactante produzido, estudaram estratégias de modo de condução do processo fermentativo e otimização do meio de produção; Santos e colaboradores (2002) desenvolveram estratégias metabólicas baseadas em condições de cultivo, visando o aumento da produção de ramnolipídeo em detrimento da produção de outros fatores de virulência; Tavares e colaboradores (2007) estudaram uma estratégia de controle da formação de espuma em biorreatores aerados por borbulhamento em associação com a investigação de estratégias de batelada alimentada; Kronemberger e colaboradores (2008) estudaram o desenvolvimento de reatores mais eficientes

(Kronenberger *et al.*, 2008); Fernandes e colaboradores (2009) realizaram o estudo da influência da oxigenação do meio sobre a produção de raminolipídeos e fatores de virulência; Reis e colaboradores (2010) realizaram o estudo de proteômica comparativa da cepa em diferentes condições fisiológicas, visando um melhor entendimento do metabolismo biossintético e genética da produção de raminolipídeo; e Gomes e colaboradores (2011) realizaram o estudo da utilização de Glicerina bruta, oriunda da produção de biodiesel para a produção destes compostos, além da superexpressão do operon *rhlAB* pela cepa *P. aeruginosa* PA1 para a otimização da produção de raminolipídeos. Santa Anna e colaboradores (2007) reportou excelentes resultados a respeito da aplicação deste bioproduto na remediação e lavagem de solos contaminados com derramamento de óleo; além disso, de Araújo e colaboradores, e Nitschke e colaboradores (2011 e 2009, respectivamente) reportaram propriedades anti-microbianas e anti-adesivas sobre diversos patógenos em superfícies de aço inox e polipropileno destes biossurfactantes.

Entretanto, apesar de todos esses avanços, que culminaram na inauguração da planta piloto de produção de biossurfactantes no IQ/COPPE - UFRJ, em 2009, o custo do biossurfactante permanece alto, quando comparado aos surfactantes sintéticos. No entanto, a utilização de um micro-organismo patogênico (*Pseudomonas aeruginosa*) mobilizou a investigação de novas cepas produtoras de biossurfactantes, assim como a utilização de hospedeiros heterólogos para a produção de raminolipídeos, uma estratégia vastamente abordada na literatura não somente para a produção de raminolipídeos, mas também para a produção de diversos metabólitos de origem microbiana. A manipulação genética visa ao remodelamento das vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos raminolipídeos, a fim de obter uma

maior produtividade destas biomoléculas. Especificamente, realizamos neste projeto a superexpressão de enzimas centrais da biossíntese de ramnolipídeos.

BURKHOLDERIA KURURIENSIS COMO HOSPEDEIRO HETERÓLOGO

5 *B. kururiensis* é uma bactéria não patogênica de vida livre que foi isolada de ambientes aquíferos poluídos com tricloroetileno no Japão (Zhang *et al.*, 2000). Em 2001, foi demonstrada a sua capacidade de fixar nitrogênio a partir de diferentes fontes, sob condições de baixa aeração, características ainda não detectadas em outras espécies do gênero *Burkholderia* (Estrada-De
10 Los Santos *et al.*, 2001). Esta espécie bacteriana diazotrófica endofítica foi isolada de cultivares de arroz inundado (Baldani *et al.*, 1997) e inicialmente denominada "*Burkholderia brasiliensis*". A mesma apresenta uma discreta produção de ramnolipídeos, cuja biossíntese, condições de produção, propriedades químicas e físico-químicas estão sendo caracterizados pelo
15 nosso grupo de pesquisa.

A utilização de *B. kururiensis* como um hospedeiro heterólogo para genes de *P. aeruginosa* mostra-se promissora devido à proximidade filogenética entre os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Estudos demonstraram que dentro do gênero *Pseudomonas* havia organismos distintos
20 dos demais, os quais foram definidos como um novo gênero: *Burkholderia* (Gillis *et al.*, 1995). Por ser uma bactéria de vida livre e não apresentar qualquer marca de virulência, *B. kururiensis* representa uma vantagem adicional em relação a *P. aeruginosa* em processos industriais de produção de biossurfactantes. Além disso, a bactéria demonstra ser excelente produtora do
25 precursor dTDP-L-raminose (Hallack *et al.*, 2010), o que constitui a fração hidrofílica do biossurfactante em questão.

O fato de *P. aeruginosa* ser um patógeno oportunista torna sua manipulação mais custosa. A produção de raminolipídeos por espécies de *Pseudomonas* possui como empecilho a sua toxicidade “in vivo”, especialmente quando *P. aeruginosa* é utilizada. A grande complexidade do sistema *Quorum sensing*, a rede de regulação transcricional que envolve a produção de raminolipídeos, faz o isolamento de cepas hiperprodutoras de *P. aeruginosa* uma tarefa não realista. Por outro lado, a produção de raminolipídeos por hospedeiros heterólogos é um objetivo desejável.

Para solucionar estas questões, utilizamos a engenharia metabólica para obtermos maior produção de biossurfactantes, empregando um microrganismo não patogênico, para assim viabilizar a utilização deste produto em processos de remediação, a custos mais competitivos. Em *B. kururiensis*, foi realizada a expressão heteróloga e constitutiva, em um único operon, das seguintes enzimas biossintéticas: 1) uma transacilase (RhIA) que gera a fração lipídica dos raminolipídios e os ácidos hidroxialcanóicos (HAA) e 2) a raminosiltransferase 1 (RhIB), que catalisa a ligação da dTDP-L-raminose à fração lipídica. Esta estratégia resultou em elevada produção de raminolipídeos (igual ou superior à de *P. aeruginosa*) em meios de culturas diversos, cujas populações moleculares foram físico-química e estruturalmente monitoradas e caracterizadas por ESI-MS-MS.

O diferencial desta técnica é a elevada produção de biossurfactantes em organismo não patogênico, *Burkholderia kururiensis*. A linhagem recombinante revelou-se uma excelente plataforma de expressão constitutiva para genes heterólogos, apresentando uma produção acima dos níveis descritos para *Pseudomonas aeruginosa*, organismo protótipo na produção de biossurfactantes raminolipídicos que, no entanto, conforme dito

anteriormente, apresenta restrições importantes nos processos de manipulação industrial devido à sua virulência e patogenicidade.

A Tabela 2 abaixo mostra uma análise comparativa entre cepas selvagens e recombinantes descritas na literatura científica e a cepa
5 *Burkholderia kururiensis* LMM21, desenvolvida em nossos estudos.

A primeira tentativa de caracterizar a expressão heteróloga dos genes *rhlA* e *rhlB* foi feita por Ochsner et al. (1994). O grupo em questão realizou a clonagem e expressão heteróloga dos genes *rhlA* e *rhlB* de *P. aeruginosa*, empregando *Escherichia coli* como plataforma de expressão, sob
10 controle do promotor *tac* (Amann et al., 1988). No entanto, os níveis de raminolipídeos obtidos foram negligenciáveis.

Em 2006, Cabrera-Valladares et al., na tentativa de obter uma cepa recombinante que fosse boa produtora de raminolipídeos e de manipulação segura na indústria, descreveram o desenvolvimento de uma
15 cepa recombinante de *E. coli*, expressando simultaneamente os grupos de genes *rhlAB* e *mlBDAC*, o que resultou em um aumento substancial em relação à estratégia anterior.

Em 2007, Wang e colaboradores (99) aumentou a produção de raminolipídeos após a integração do cluster *RhlAB* no cromossomo da cepa de
20 *P. aeruginosa* PEER02. Embora a produção tenha sido superior à da cepa selvagem, a transformação utilizou como hospedeiro uma cepa patogênica. Uma cepa transformada de *E.coli* também foi gerada, resultando em uma produção ligeiramente superior ao trabalho publicado anteriormente.

Um quarto grupo desenvolveu, em 2008, uma recombinante de
25 *Pseudomonas putida* que expressa, além dos genes para enzimas biossintéticas de raminolipídeos (*rhlA* e *rhlB*), genes regulatórios do sistema de Quorum Sensing (*rhlI* e *rhlR*), todos provenientes de *P. aeruginosa*. Foi

alcançado um nível de produção até então sem precedentes (6,97 g/L), conforme demonstrado na tabela 2 abaixo.

Nossos resultados demonstram que a produção de biossurfactantes pela cepa LMM21 são, significativamente, maiores do que aqueles produzidos pelas cepas recombinantes de *E. coli* descritas e equivalentes aos níveis produzidos por *P. putida*, que contem o cluster *rhIRIAB* oriundo de *P. aeruginosa*.

Vale ressaltar que, em todos os trabalhos citados, incluindo o trabalho em questão, foi empregado o processo de fermentação submersa, utilizando diversos meios líquidos sintéticos, com frascos em agitação.

Tabela 2: Relação de hospedeiros heterólogos já produzidos para a superprodução de raminolipídeos.

Cepas	RML	Tempo de cultivo	Rendimento (mg/L.h ⁻¹)	Tensão superficial	Tipo de expressão	Referência
<i>E. coli</i>	< 1.0mg/L	20h	0.05	ND	Indutível	Ochsner <i>et al.</i> , 1994
<i>E.coli</i>	120mg/L	60h	2.0	ND	Indutível	Cabrera-Valladares <i>et al.</i> , 2006
<i>P. aeruginosa</i> PEER02	1.8 g/L	4	18.75	ND	Controlada por genes homólogos de QS	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i> TnERAB	175 mg/L	1	7.29	ND	ND	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>P. putida</i>	6.97g/L	7 dias	41.5	ND	Controlada por genes heterólogos de QS	Cha <i>et al.</i> , 2008
<i>B.kururiensis</i> LMM21	7.4 g/L	10 dias	30.83	28 mN/m	Constitutiva	Presente trabalho

ND – não determinado

QS – Quorum Sensing

Com os resultados expostos acima, demonstra-se mais uma vez que o principal diferencial do método objeto da presente invenção é a produção de biossurfactantes em níveis maiores que os relatados na literatura, em uma

5 plataforma não patogênica de expressão heteróloga, também excelente produtora do precursor dTDP-L-raminose (Hallack *et al.*, 2010), o qual constitui a fração hidrofílica do biossurfactante em questão. Além disso, a engenharia metabólica adotada em nosso trabalho inclui somente enzimas biossintéticas, exclusivamente dedicadas à síntese de raminolípídeos (RhIA e RhIB),

10 expressas de forma constitutiva, sem o envolvimento de vias globais de regulação gênica, como o sistema QS, empregado na estratégia descrita por Cha *et al.* (2008). O emprego de proteínas regulatórias do sistema QS, também presente em *P. putida* (Bertani e Venturi, 2004), plataforma utilizada no trabalho acima citado, resulta em alterações generalizadas na célula

15 hospedeira, podendo produzir fenótipos imprevisíveis, além da produção de raminolípídeos, o que torna o sistema difícil de ser controlado. Finalmente, a utilização de *B. kururiensis*, bactéria ambiental e fixadora de nitrogênio (Zhang *et al.*, 2000; Estrada-de-los-Santos *et al.*, 2001), dispensa a adição de fontes de nitrogênio aos meios de produção, obtendo-se excelentes resultados,

20 o que também representa uma vantagem em relação aos métodos anteriormente descritos.

O método proposto consiste na produção de biossurfactantes do tipo raminolípídeo em uma cepa não patogênica, *B. kururiensis* KP23^T, como hospedeira heteróloga, através da inserção de plasmídeos contendo os genes

25 *rhlAB*, oriundos da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, responsáveis pela produção das enzimas componentes da Rhamnosiltransferase 1 (RhIA e RhIB), envolvidas na produção de mono-raminolípídeos. Ensaios iniciais em

meio rico (LB) indicaram maior produção de ramnolipídeos pela cepa recombinante (*B. kururiensis* LMM21) em relação à cepa selvagem (plataforma de expressão) e a *P. aeruginosa* PAO1. A partir disso, ensaios envolvendo o cultivo em meio de sais contendo glicerol como fonte de carbono foram realizados em frascos sob agitação, levando à produção de índices semelhantes aos alcançados pela cepa genômica PAO1, cujo trabalho de otimização da produção vem sendo conduzido por nosso grupo de pesquisa desde 1998.

A partir do meio de cultivo fermentado livre de células, uma etapa de purificação foi realizada através de acidificação do sobrenadante, seguida por extração por solvente, obtendo-se um extrato bruto, que foi utilizado para a caracterização da molécula produzida. Testes em CCD foram preliminarmente realizados, seguidos por testes em HPLC e, por fim, espectrometria de massas. Os resultados indicaram que no CCD, duas bandas com mesmo Rf que os do extrato bruto utilizado como padrão (PAO1) foram encontrados, indicando grande similaridade entre os compostos. Análises das frações hidrofílicas do material hidrolisado em CCD e HPLC indicaram raminose como o açúcar presente nas mesmas. Os dados obtidos por espectrometria de massas indicam que, na cepa LMM21 ocorre uma maior produção de mono-ramnolipídeos em função de di-ramnolipídeos, o contrário do observado com a cepa PAO1, corroborando com o já esperado. Espécies similares de raminolipídeos foram observadas nas duas análises.

O sobrenadante livre de células e o extrato de raminolipídeos foram também utilizados para a caracterização das propriedades tenso-ativas do biossurfactante produzido pela cepa LMM21. Observou-se que os índices de emulsificação foram superiores a 60%, considerados excelentes e de grande estabilidade temporal. Valores de tensão superficial de cerca de 30

mN/m, condizentes com o que é descrito para raminolipídeos (valores de 25-35 mN/m) foram encontrados, sendo a CMC encontrada em torno de 120mg/L, superior ao encontrado para PAO1, porém, ainda dentro do descrito para estes compostos.

- 5 A partir destes resultados, ficou comprovado que a cepa geneticamente modificada (LMM21) promoveu aumento substancial da produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo.

TABELA 3 - BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS EMPREGADOS NO TRABALHO

Bactérias/Plasmídeos	Descrição	Origem ou referência
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Selvagem, cepa genômica	Holloway et al., 1979; Stover et al., 2000
<i>B. kururiensis</i> KP23 ^T	Selvagem, isolada de ambiente aquífero no Japão	Zhang et al., 2000
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96relA1 thiΔ(lac-proAB)</i>	New England Biolabs
LMM21	<i>B. kururiensis</i> KP23 ^T contendo o plasmídeo pLMM12	Este estudo
pGEM-T	Vetor plasmidial para clonagem de produtos de PCR; Amp ^R	Promega
pTrc99A	Derivado do pKK233-2; vetor de expressão contendo o promotor <i>tac</i> ; Amp ^R	Amann et al., 1988
pLMM11	pGEM-T contendo os genes <i>rhIA</i> e <i>rhIB</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este estudo
pLMM12	pTrc99A contendo os genes <i>rhIA</i> e <i>rhIB</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este estudo

TÉCNICAS MOLECULARES

Inicialmente, foram amplificados os genes alvo *rhIA* e *rhIB*, a partir do DNA genômico *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se primers que amplificaram um fragmento de 2.233 pares de bases, contendo ambos os genes *in tandem*, inclusive região intergênica (Figura 1). Os primers empregados foram RhIA_{PAO1}-F (5' CCGGAATTCATGCGGCGCGAAAGTCTGTTG 3') e RhIB_{PAO1}-R (5' CCGGAATTCTCAGGACGCAGCCTTCAGCCA 3'). Os ciclos empregados foram 95°C por 1 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 8 min, finalizando com 72°C por 6 min, utilizando *Pfu* polimerase. Após purificação, este produto foi inserido no plasmídeo pGEM-T e, em seguida, no vetor de expressão pTrc99A. Esta construção foi inicialmente testada em *Escherichia coli*, sendo a expressão da enzima testada por eletroforese em SDS-PAGE, onde encontramos a presença de duas proteínas com o peso aproximado de 29,5 kDa e 42,6 kDa, equivalentes aos produtos dos genes *rhIA* e *rhIB*, respectivamente, 24 horas após a indução (dados não mostrados). Posteriormente, esta construção foi transferida para *Burkholderia kururiensis* (KP23), gerando a cepa recombinante que foi designada LMM21, onde os testes seguiram quanto à produção de raminolipídeos.

A Figura 2 mostra a representação esquemática do operon *rhIAB* de *P. Aeruginosa*, onde o diagrama ilustra a organização do operon da raminosil-transferase 1 (cadeias A e B) adaptado do GenBank (Stover et al., 2000); as setas representam cada uma das fases de leitura. O retângulo cinza delimita o comprimento do fragmento amplificado, contendo os genes da raminosil-transferase 1 (*rhIA* e *rhIB*) em toda a sua extensão e a região intergênica.

MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO EMPREGADOS NA PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Para a produção dos biossurfactantes, as bactérias foram reativadas "overnight" em meio LB líquido, a 28°C, 170 rpm, a partir do estoque armazenado em freezer -80°C. Após a reativação, 1,0 mL da suspensão de células foi inoculada em frascos erlenmeyer de 1.000 mL contendo 300 mL de meio de pré-inóculo (K₂HPO₄ 7.0 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L, NaNO₃ 1.0 g/L, MgSO₄.7H₂O 0.2 g/L, Glycerol 30.0 g/L, Extrato de levedura, 5.0 g/L, Peptona bacteriana, 5.0 g/L) (Santos et al, 2002), e incubado a 28°C, 170 rpm, por 40 horas. As células foram então concentradas por centrifugação a 6.000 xg, por 25 minutos e, então, inoculadas em frascos erlenmeyers contendo 500 mL de meio salino de produção (MSP) (K₂HPO₄ 7.0 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L, NaNO₃ 1.4 g/L, MgSO₄.7H₂O 0.2 g/L, Glicerol 30.0 g/L) (Santos et al., 2002), a uma concentração final de células de 1,0 g/L. O cultivo foi conduzido a 28°C, 170 rpm. Para os testes comparativos entre as cepas, o cultivo foi conduzido por 120 horas. Além do glicerol, foram testados como fontes de carbono n-hexadecano e óleo de oliva, em concentração final de 12.5g/L.

Testes com a recombinante LMM21, envolvendo diferentes fontes de carbono, foram conduzidos por 240 horas. Foram testadas 13 diferentes fontes de carbono (glicerol, óleo de oliva, óleo de soja, óleo de canola, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de babaçu, óleo diesel, biodiesel metílico de soja, n-hexadecano, óleo mineral, óleo de motor e glicerina loira), sendo então para estes afixada a relação C/N (proporção de carbono e nitrogênio disponíveis para consumo microbiano) para 71, resultando em diferentes concentrações dos substratos acima citados.

Aliquotas foram retiradas a cada 24 horas para monitoramento do crescimento, produção de biossurfactantes, e consumo de nutrientes, como descritos abaixo. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os

resultados expressos como a média aritmética entre os valores obtidos, sendo o desvio padrão representado por barras de erro.

BIOMASSA

A concentração celular dos sobrenadantes foi medida pela leitura de densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 spectrophotometer, Pharmacia Biotech), sendo utilizada como branco da amostra água destilada. Os valores foram então convertidos em peso seco (g/L) através de uma curva de peso seco x DO_{600} previamente realizada.

QUANTIFICAÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS

A quantificação dos raminolipídeos foi realizada através da dosagem da fração glicídica do biossurfactante (L-ramnose) presente nos sobrenadantes livres de células por método colorimétrico (reação de orcinol; Koch et al., 1991). Os valores em raminose observados foram então convertidos a raminolipídeos, através de fatores obtidos pela análise do perfil da composição dos biossurfactantes.

TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

MEDIDA DA TENSÃO SUPERFICIAL

A medida da tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes livres de células foi realizada em tensiômetro Aqua-Pi (Kibron Inc., Helsinki), a 25°C, baseadas no método Du Noüy, sendo utilizadas agulhas de platina. Para os cálculos da concentração micelar crítica (CMC), amostras contendo diluições progressivas dos extratos brutos previamente obtidos em solução de eletrólitos foram utilizadas para a medida da tensão superficial.

Antes de cada experimento, o instrumento foi calibrado com água ultrapura. As medidas de tensão superficial foram realizadas até a variação das mesmas estar contidas em um erro de $\pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$.

ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

As medidas de emulsificação foram realizadas, segundo método descrito por Cooper & Goldenberg (1987). Valores iguais de n-hexadecano e sobrenadante livre de células foram adicionados a microtubos de 2.0 mL e vigorosamente agitados em vortex por 2 min. O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado após 24 horas de incubação em repouso, a temperatura ambiente, pela divisão da altura da emulsão pela altura total da mistura, e multiplicação por 100.

EXTRAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

A extração dos biossurfactantes foi realizada a partir dos sobrenadantes livres de célula obtidos após 240 horas de cultivo em meio MSP, suplementado com glicerol como fonte de carbono. O sobrenadante foi acidificado a pH 3.5 com HCl 6N, e foi realizada, então, uma extração direta com acetato de etila (1:3; sobrenadante:acetato de etila) (Dubeau et al., 2009). A fase orgânica foi, então, separada, desidratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador (Heto Drywinner), para a recuperação do solvente. O produto resultante foi, então, recuperado do balão de secagem com metanol, seco em atmosfera de nitrogênio e armazenado a -20°C.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

PREPARO DA AMOSTRA

Todas as amostras foram diluídas em tampão MS-mix composto por Metanol:Clorofórmio:2-propanol (1:2:4) contendo acetate de amônio 7.5 mM, e posteriormente filtradas em cartuchos contendo membrana PVDF 0.22 μ m (Millipore).

ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras de biossurfactantes foram analisadas em um LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), utilizando capilares de nano-fluxo (PicoTip Emitter, Glass Tip, coating 1P-4P, New

Objective, MA, Estados Unidos), com voltagem de ionização de 2.8 kV e temperatura de transferência do capilar a 200°C. Cada aquisição de dados consistiu em uma varredura cobrindo ao intervalo entre 100 e 2000 m/z, analisado pelo Orbitrap, seguido por fragmentação MS/MS dos precursores mais abundantes previamente isolados por CID no modo FT-MS, com resolução de 60.000 e tempo máximo de injeção de 20.000 ms. Para a fragmentação dos precursores, energias de colisão de 35% foram utilizadas com o CID e 50%, quando o HCD foi utilizado.

Os dados adquiridos foram processados com o auxílio do software Xcalibur e apenas picos apresentando erros inferiores a 5ppm foram considerados para análises posteriores.

PRODUÇÃO, CINÉTICA DE PRODUÇÃO RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS PELA CEPA LMM21

Os testes com a cepa recombinante LMM21 para a produção de raminolipídeos foram realizados, conforme ilustrado na Figura 2, através do ensaio de orcinol, que mede indiretamente os equivalentes de rhamnose (ER), posteriormente convertidos a raminolipídeos. Observou-se um aumento significativo na cepa LMM21 quando comparada à cepa selvagem de *B. kururiensis* e à própria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Diversas outras análises foram realizadas para confirmar e autenticar os dados apresentados acima, como ensaios para medir as taxas de emulsificação e tensão superficial do meio de cultivo. As taxas de emulsificação produzidas na presença de n-hexadecano corroboram com o resultado obtido para a quantificação da produção de raminolipídeos. As taxas de emulsificação geradas após ensaio realizado ao longo da cinética de produção do biossurfactante foram semelhantes entre nosso controle positivo (*P. aeruginosa*) e as células LMM21 (superexpressam as enzimas *rhlAB*); em

torno de 70 e 60 % respectivamente, enquanto *B. kururinsensis* apresentou 25%, valor máximo obtido após 5 dias de cultivo.

Níveis de tensão superficial foram medidos entre estas diferentes cepas, em ensaio envolvendo o extrato bruto obtido a partir do sobrenadante livre de células para a determinação da CMC. As mesmas características foram observadas em *P. aeruginosa* e a cepa LMMP21.

TABELA 4 - PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS EM MEIO MSP SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO. Testes avaliando a utilização de diversos substratos foram conduzidos com a cepa *B. kururiensis* LMM21, obtendo-se resultados que indicam a possibilidade de utilização de produtos e rejeitos como fonte de carbono para a produção destes compostos.

Substrato	Raminolipídeos (g/L)	Emulsificação (%)	Tensão superficial (mN/m)
Glicerol	7,43	55,2	31,0
Óleo de oliva	1,61	58,6	30,2
Óleo de soja	0,77	51,7	30,8
Óleo de canola	1,91	48,5	30,0
Óleo de milho	3,34	6,9	33,2
Óleo de girassol	3,98	17,2	33,3
Óleo de babaçu	3,33	55,2	30,9
N-hexadecano	0,25	62,1	35,7
Óleo mineral	0,28	44,8	46,9
Óleo de motor	0,29	31	48,5
Biodiesel de soja	3,38	56,7	33,3
Glicerina loira	5,09	64,9	32,8
Óleo diesel	0,96	55,2	31,4

TABELA 5 - PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS EM MEIO MSP SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO. Testes avaliando a utilização de diversos substratos foram conduzidos com a cepa *B. kururiensis* KP23^T, obtendo-se resultados que indicam a possibilidade de utilização de produtos e rejeitos como fonte de carbono para a produção destes compostos.

Substrato	Ramnilipídeos (g/L)	Emulsificação (%)	Tensão superficial (mN/m)
Glicerol	1,77	48,3	38,1
Óleo de oliva	1,41	51,7	28,1
Óleo de soja	1,12	55,2	30,3
Óleo de canola	1,28	58,6	29,7
Óleo de Milho	1,09	55,2	30,9
Óleo de Girassol	1,36	58,6	29,2
Óleo de Babaçu	1,16	62,1	28,1
N-hexadecano	0,34	46,4	46,4
Óleo Mineral	0,35	50,0	44,2
Óleo de motor	0,18	0,0	42,6
Biodiesel de soja	1,51	53,6	29,9
Glicerina loira	0,74	41,4	28,8
Óleo diesel	0,31	13,8	40,8

A Figura 3 demonstra a cinética da produção de biossurfactantes por (a) *B. kururiensis* LMM21 e (b) *P.aeruginosa* PAO1, onde os gráficos representam culturas realizadas em meio MSP suplementado com glicerol como fonte de carbono. As curvas demonstram crescimento e progresso da produção de ramnilipídeos, revelando que na cepa LMM21 (a) a produção dos biossurfactantes segue uma trajetória exponencial contínua, enquanto na cepa PAO1 (b) a produção dos biossurfactantes é diretamente associada ao crescimento celular, com a trajetória exponencial acentuando-se na fase estacionária do crescimento bacteriano. Ambos os comportamentos relacionam-se aos tipos diferentes de expressão, (a) constitutiva ou (b) controlada por Quorum Sensing.

A Figura 4 mostra o rendimento da produção de ramnilipídeos quantificação do rendimento da produção de ramnilipídeos pelas cepas *B. kururiensis* KP23, LMM21 e *P. aeruginosa* PAO1, utilizando glicerol, óleo de oliva, ou n-hexadecano como fontes de carbono. O rendimento é expresso como a relação entre a produção de ramnilipídeos e o log número de células bacterianas viáveis (unidades formadoras de colônias – UFC).

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ESPÉCIES MOLECULARES DE RAMINOLIPÍDEOS PRODUZIDOS PELA CEPA LMM21

Foram conduzidas análises do extrato purificado através de espectrometria de massas, para avaliar e comparar a composição das moléculas produzidas pelas cepas *P. aeruginosa* (PAO1) e *B. kururiensis* (LMM21), além do perfil de produção das mesmas. Como observado nas Figuras 7 e 8, picos de massas semelhantes foram obtidos nas duas cepas, com predominância de cadeias de ácidos graxos dos tipos C₈, C₁₀ e C₁₂. Análises do perfil de espécies moleculares produzidas (Tabelas 1 e 2) indicam que existe a predominância de duas espécies de raminolipídeos: Rha-C₁₀C₁₀ e Rha-Rha-C₁₀C₁₀ (Figuras 9 e 10), ocorrendo, no entanto, uma predominância de mono-ramnolipídeos na cepa *B.kururiensis* LMM21, o que condiz com a estratégia molecular utilizada, a qual favorece a maior produção de mono-ramnolipídeos.

A Figura 5 mostra a análise do perfil de raminolipídeos produzidos por *Burkholderia kururiensis* LMMP21. Espectro obtido por ESI-MS.

A Figura 6 mostra a análise do perfil de rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Espectro de massas obtido por ESI-MS.

TABELA 6 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS POR *BURKHOLDERIA KURUSIENSIS* LMM21

Espécie	Massa	% Absoluto
Mono-raminolipídeos		
Rha-C ₈ C ₁₀ /C ₁₀ C ₈	475	16.65
Rha-C ₁₀ C ₁₀	503	40.98
Rha-C ₁₀ C _{12:1} /C _{12:1} C ₁₀	529	5.52
Rha-C ₁₀ C ₁₂ /C ₁₂ C ₁₀	531	2.62
Total		65,77%
Di-raminolipídeos		
Rha-Rha-C _{12:1}	505	2.30
Rha-Rha-C ₈ C ₁₀ /C ₁₀ C ₈	621	5.33

Rha-Rha-C ₁₀ C ₁₀	649	21.36
Rha-Rha-C ₁₀ C _{12:1} /C _{12:1} C ₁₀	675	2.60
Rha-Rha-C ₁₀ C ₁₂ /C ₁₂ C ₁₀	677	2.64
Total		34,23%

TABELA 7 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1

Espécie	Massa	% Absoluto
Mono-raminolipídeos		
Rha-C ₈ C ₁₀ /C ₁₀ C ₈	475	8.21
Rha-C ₁₀ C ₁₀	503	15.18
Total		23,39%
Di-raminolipídeos		
Rha-Rha-C ₈ C ₁₀ /C ₁₀ C ₈	621	13.90
Rha-Rha-C ₁₀ C ₁₀	649	59.54
Rha-Rha-C ₁₀ C _{12:1} /C _{12:1} C ₁₀	675	3.17
Total		76,61%

5

A Figura 7 mostra a representação estrutural das espécies mais abundantes de raminolipídeos, R1 (RhaC₁₀C₁₀ e R2 (RhaRhaC₁₀C₁₀) em posição de energia mínima (Helvaci, Peker et al. 2004), provenientes de *B. kururiensis* LMM21 e *P. aeruginosa* PAO1. As estruturas descritas foram determinadas por ESI-MS-MS, a partir do extrato obtido após cultivo em MSP suplementado com glicerol.

Estes dados mostram que a *B. kururiensis* recombinante (LMM21), expressando RhlA e RhlB da cepa PAO1, apresenta produção de um mesmo perfil estrutural de raminolipídeos que a própria PAO1, no que se refere à população de moléculas. Desta forma, a cepa LMM21 mostra-se uma linhagem bacteriana viável e promissora para a utilização industrial. Todos os dados apontam para uma surpreendente e desejável semelhança entre LMM21 e PAO1, em relação aos raminolipídeos produzidos, desde a redução da tensão superficial, taxas de emulsificação na presença de n-hexadecano, além do perfil estrutural e de produção de raminolipídeos em meio mínimo. Um dado

20

importante a ser ressaltado seria o fato da cepa LMM21 não apresentar patogenicidade, o que despertaria grande interesse.

A Figura 8 representa o mapa do plasmídeo pLMM12 (pTrc99A contendo os genes *rhIA* e *rhIB* de *P. aeruginosa* PAO1, sob controle do
5 promotor *fac*).

REIVINDICAÇÕES

- 1- *Burkholderia kururiensis* geneticamente modificada (LMM21) caracterizada pelo fato de utilizar cepas de bactérias, bem como clonagem e expressão construtiva da transacilase ou cadeia A da raminosil-transferase 1 (RhIA) e cadeia B da raminosil-transferase 1 (RhIB) de *Pseudomonas aeruginosa* PAQ1.
5
- 2- Método de produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeos, caracterizado por utilizar a cepa de *Burkholderia kururiensis* geneticamente modificada (LMM21) como plataforma para expressão construtiva de genes heterólogos.
10
- 3- Método de produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cepa de *Burkholderia kururiensis* é geneticamente modificada (LMM21) por cepas de bactérias, bem como clonagem e expressão construtiva da transacilase ou cadeia A da raminosil-transferase 1 (RhIA) e cadeia B da raminosil-transferase 1 (RhIB) de *Pseudomonas aeruginosa* PAQ1.
15
- 4- Método de produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de utilizar plataformas de expressão que compreendam parte da via biossintética dos raminolipídeos, como as presentes em *Burkholderia kururiensis* LMM21, detentora de genes para biossíntese dos precursores de dTDP-L-raminose (genes *rmIBDAC*) e HAAs (*rhIG*).
20
- 5- Método de produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os genes *rhIA* e *rhIB* de *P. aeruginosa* PAQ1 são inseridos na bactéria *Burkholderia kururiensis*, sob controle do promotor *tac*, ou qualquer outro que
25

proporcione expressão constitutiva nesta plataforma de expressão, tornando-a capaz de produzir elevadas quantidades de raminolipídeos.

6- Método de produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de
5 utilizar diferentes substratos como glicerol puro ou bruto, óleo de oliva, óleo de soja, óleo de canola, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de babaçu, óleo diesel, biodiesel metílico de soja, n-hexadecano, óleo mineral, óleo de motor e glicerina loira como fonte de carbono.

7- Método de produção de biossurfactantes do tipo
10 raminolipídeos de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de utilizar preferencialmente glicerol puro ou bruto como fonte de carbono.

8- Biossurfactantes do tipo raminolipídeos, caracterizados pelo fato de serem produzidos segundo o método descrito nas reivindicações 2-7.

15 9- USO dos biossurfactantes em sua forma bruta ou purificada conforme descrito na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de ser aplicado em processos de biorremediação de solos e águas.

FIGURAS

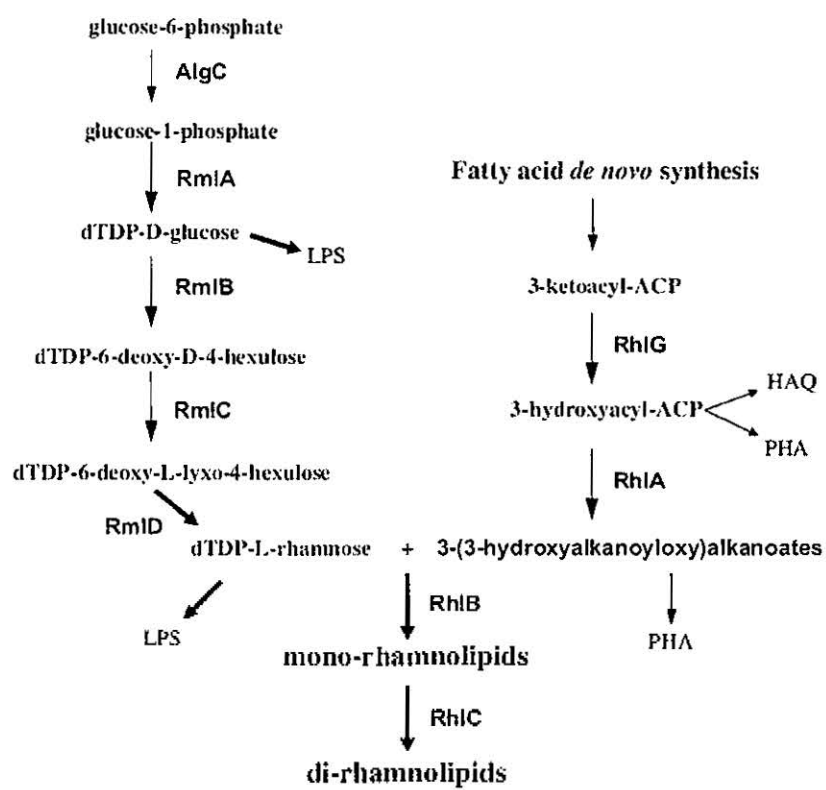


Figura 1

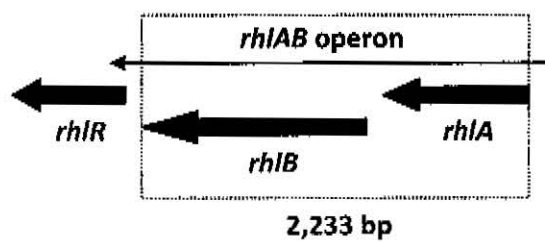


Figura 2

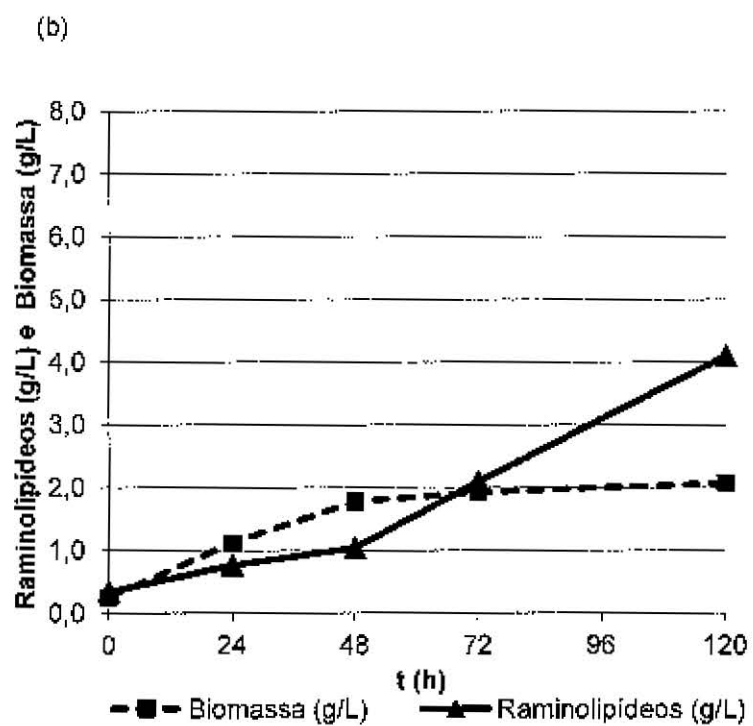
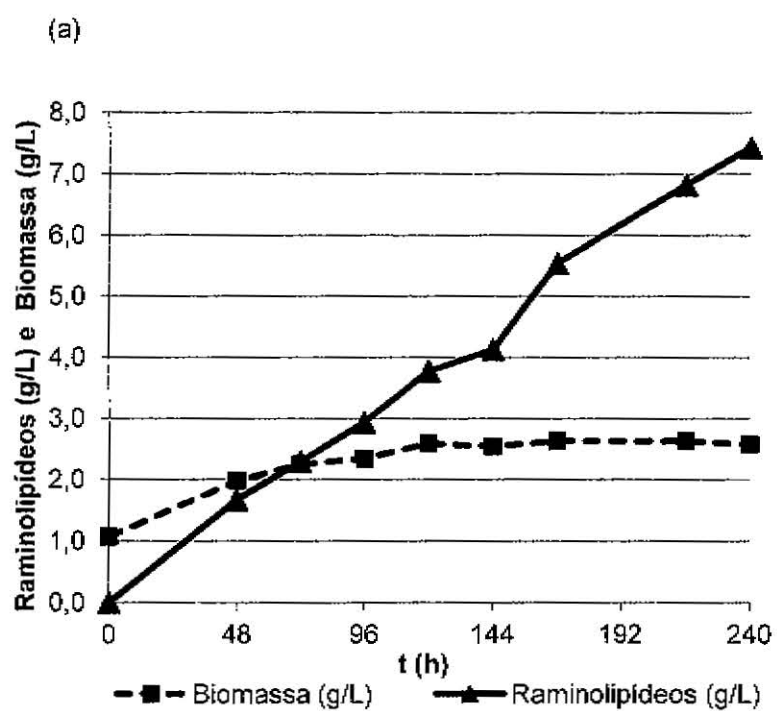
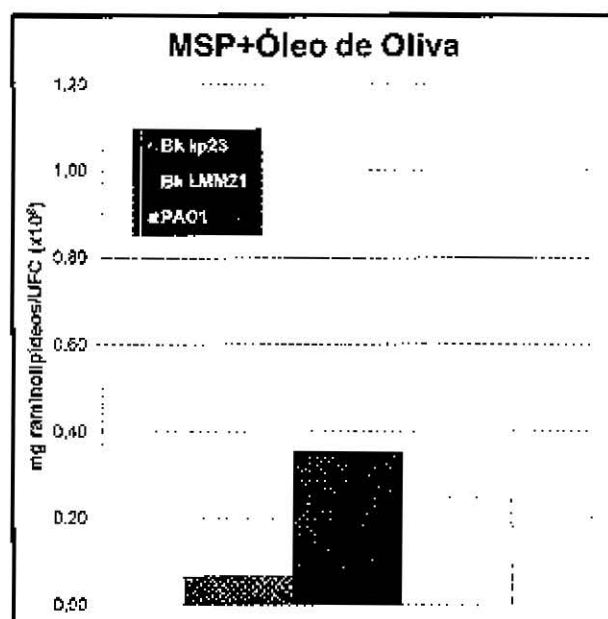
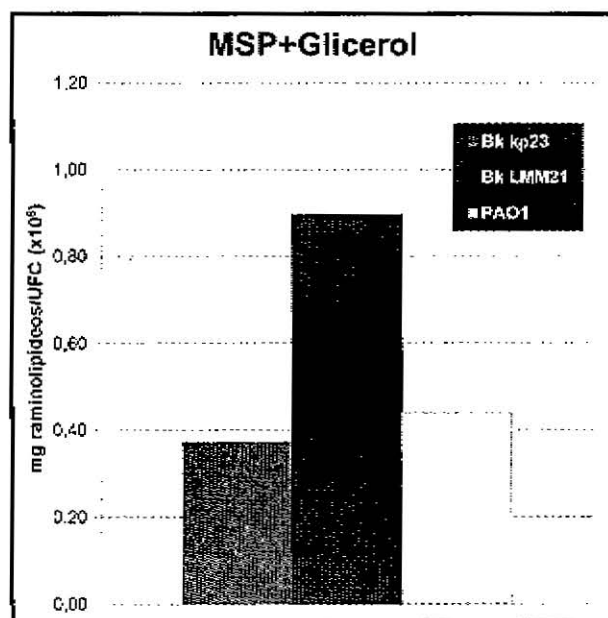


Figura 3



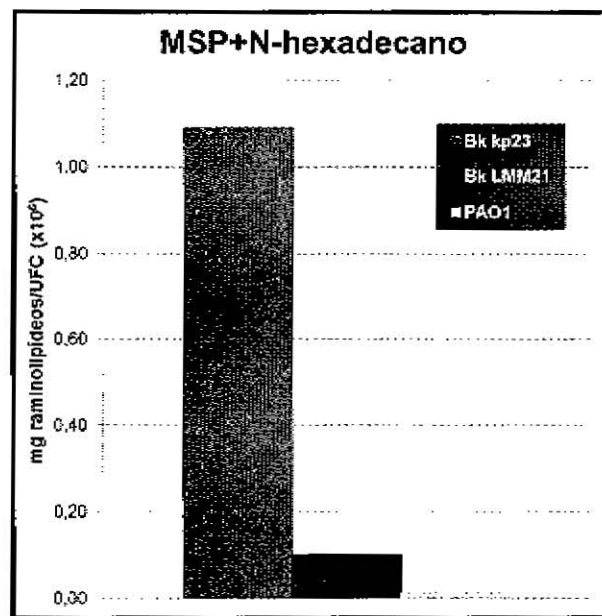


Figura 4

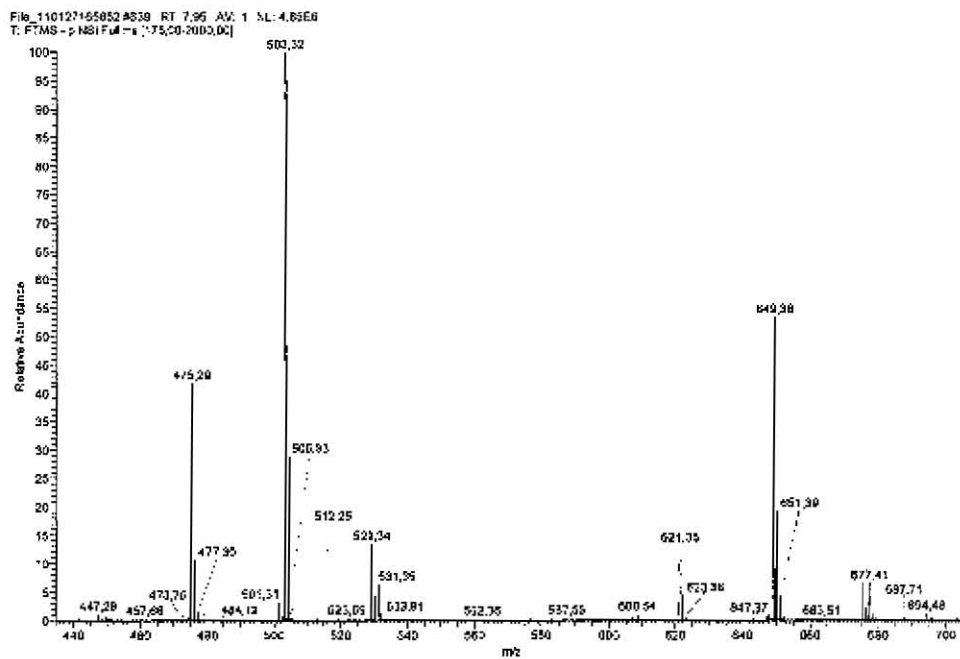


Figura 5

pac1_101221153722 #59 RT: 0.46 AV: 1 NL: 1.62E8
T: FTMS - p NSI Full ms [50,00-2000,00]

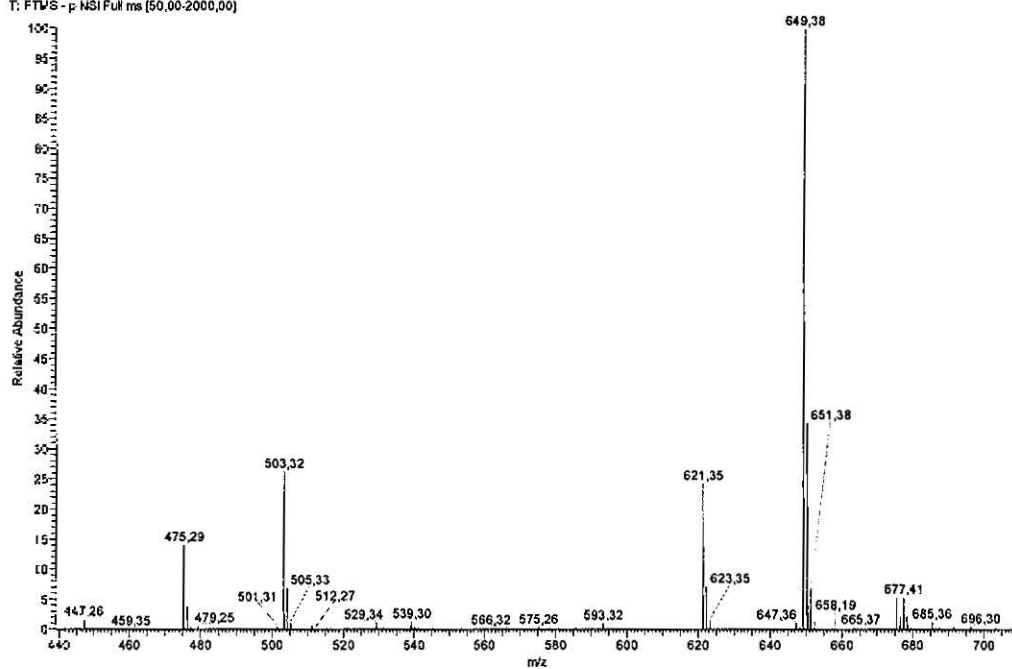


Figura 6

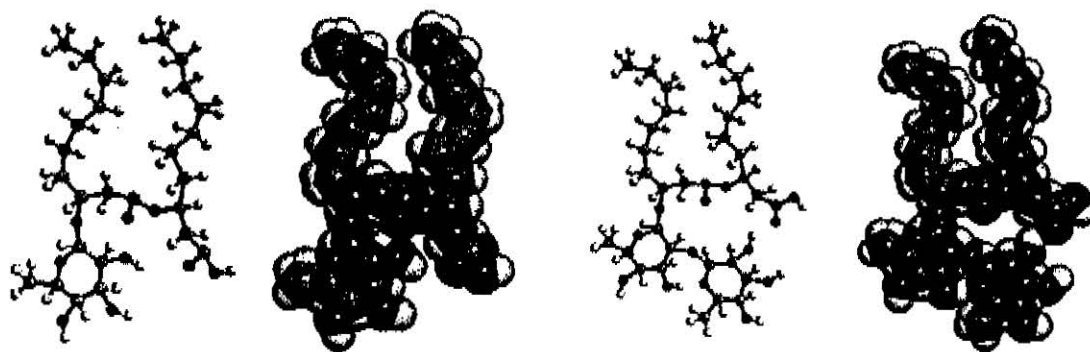


Figura 7

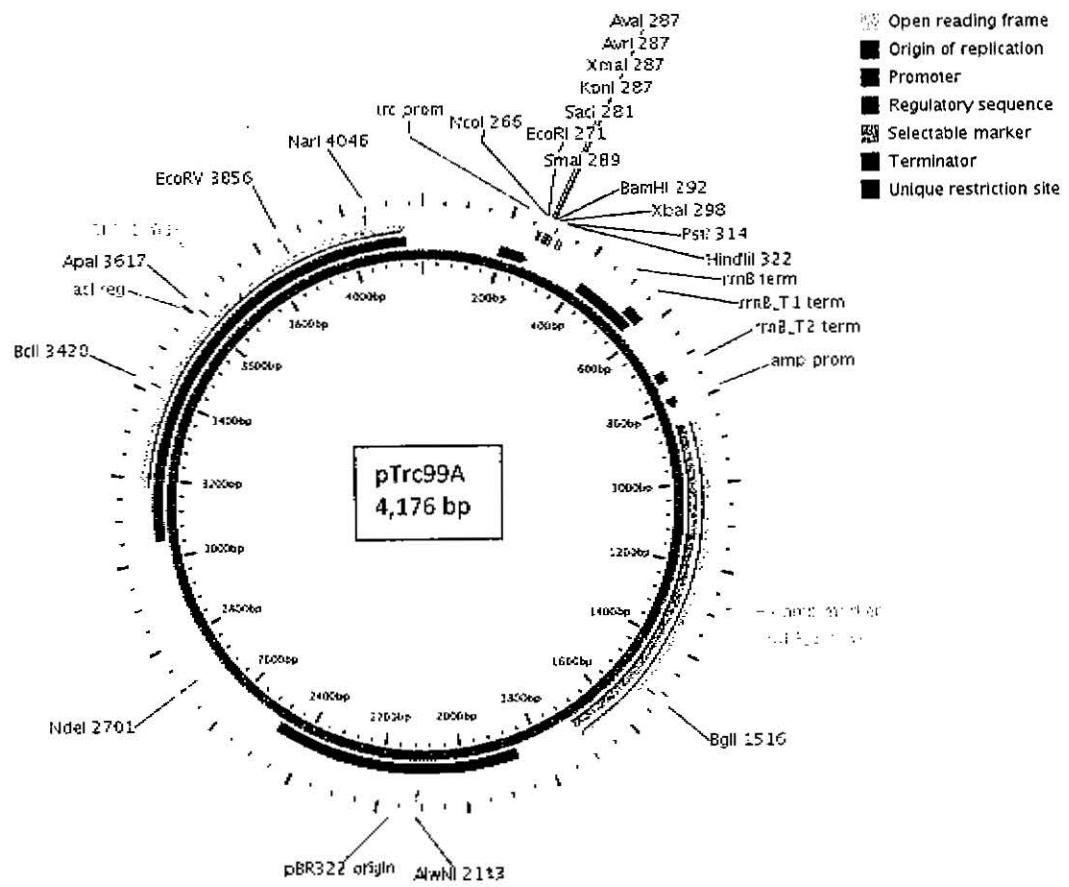


Figura 8

RESUMO**BURKHOLDERIA KURURIENSIS GENETICAMENTE MODIFICADA, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES DO TIPO RAMINOLIPÍDEOS E USOS**

5 A presente invenção descreve *Burkholderia kururiensis* geneticamente modificada (LMM21) e um método de utilização da engenharia genética como ferramenta para a produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo em uma cepa não patogênica, *B. kururiensis* KP23^T, como hospedeira heteróloga, através da inserção de plasmídeos contendo os genes
10 *rhlAB*, oriundos da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, responsáveis pela produção das enzimas componentes da Rhamnosiltransferase 1 (RhlA e RhlB), envolvidas na produção de mono-raminolipídeos e seu uso em biorremediação de solos e águas, que apresentam contaminação por hidrocarbonetos.